

581.1(05)

Embrapa



REVISTA BRASILEIRA DE FISIOLOGIA VEGETAL

BRAZILIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY

REVISTA BRASILEIRA DE ...
v.9, n.1, Abril. 1997



CPAA-779-18

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISIOLOGIA VEGETAL

APLICAÇÃO DE FORMONONETINA SINTÉTICA AO SOLO COMO ESTIMULANTE DA FORMAÇÃO DE MICORRIZA NO MILHO E NA SOJA¹

José Pereira da Silva-Júnior² e José Oswaldo Siqueira³

Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, CP 37, Lavras, MG, 37200-000.

RESUMO- Estudaram-se, através de dois experimentos, os efeitos da aplicação no solo, de formononetina (7-hidroxi,4'-metoxi-isoflavona) sintética nas concentrações de 0, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹, na formação de micorriza arbuscular e crescimento do milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em vasos com Latossolo Vermelho Amarelo em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo - UFLA, Lavras (MG). A aplicação de formononetina na semeadura aumentou a porcentagem de colonização, a densidade de arbúsculos e vesículas nas raízes da soja e do milho inoculadas com o fungo micorrízico *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. O efeito estimulante da formononetina foi maior no milho do que na soja, sendo máximo em concentração de 5 a 10 mg.L⁻¹ de solução. Apesar dos efeitos na formação de micorriza, o isoflavonóide não aumentou a produção de massa seca do milho e teve um efeito de 9,4% sobre a soja.

Termos adicionais para indexação: bioestimulante, endomicorriza, fungo micorrízico, *Glomus etunicatum*, *Glycine max*, isoflavonóide, metabólito vegetal simbiose, *Zea mays*.

SOIL-APPLIED SYNTHETIC FORMONONETIN STIMULATES ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FORMATION IN CORN AND SOYBEAN

ABSTRACT- The effects of soil-applied synthetic formononetin (7-hydroxy,4'-methoxy isoflavone) at increasing concentrations (0, 5, 10, 15 mg.L⁻¹) on arbuscular mycorrhizal colonization of corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) were studied in two glasshouse pot experiments at the Soil Science Department of UFLA, Lavras (MG). Soil application of

formononetin at sowing enhanced percent of root colonization and density of arbuscules and vesicles in both species inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. The stimulating effect of formononetin was greater in corn than in soybean, and it was maximum at formononetin concentrations ranging from 5 to 10 mg.L⁻¹. In spite of the stimulating effect on mycorrhizal formation, soil-applied formononetin had no effect on corn dry matter production, whereas it increased soybean dry matter yield by 9.4%.

Additional index terms: biostimulant, endomycorrhiza, *Glomus etunicatum*, *Glycine max*, isoflavonoid, mycorrhizal fungi, plant metabolite, symbiosis, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

Micorriza arbuscular (MA) é uma simbiose mutualista biotrófica, de ocorrência generalizada nas plantas vasculares, resultante da associação entre raízes e fungos da ordem Glomales, exercendo efeitos benéficos para o crescimento do hospedeiro em condições de estresse nutricional (Siqueira, 1994). Apesar do grande volume de estudos sobre esta simbiose e da importância destas para a produção agrícola e sustentabilidade dos ecossistemas, sua exploração nos cultivos anuais é ainda inviável economicamente. Uma das alternativas apontadas para aumentar a contribuição desta simbiose nas culturas anuais é a maximização da atividade dos fungos indígenas do solo, através de práticas de manejo seletivas ou do uso de estimulantes da formação de micorriza arbuscular (Siqueira et al., 1991a, 1992).

O processo de colonização das raízes envolve uma série de eventos morfo-fisiológicos e bioquímicos, regulados pelo genoma do fungo e da planta, bem como por fatores ambientais. Os exsudatos radiculares (Elias & Safir, 1987), a presença de raízes (Becard & Piché, 1989) e de células vegetais ou seus extratos (Paula & Siqueira, 1990) estimulam o

¹Recebido em 11/09/1995 e aceito em 23/01/1997.

²Eng^o. Agr^o., MS, Pesquisador da Embrapa/CPAA, CP 319, Manaus, AM, 69011-970.

³Eng^o. Agr^o., Ph.D., Departamento de Ciência do Solo, UFLA, CP 37, Lavras, MG, 37200-000, Bolsista do CNPq.

crescimento assimbiótico destes fungos *in vitro*, indicando a existência de fatores químicos ativos. Nair et al. (1991) identificaram a partir de raízes de trevo deficientes em fósforo, o isoflavonóide formononetina, capaz de estimular o crescimento assimbiótico de fungos micorrízicos arbusculares. A atividade sobre os fungos micorrízicos arbusculares foi confirmada em vários outros estudos *in vitro* com diferentes espécies fúngicas e flavonóides (Baptista & Siqueira, 1994; Chabot et al., 1992; Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Morandi et al., 1992; Romero & Siqueira, 1996 e Tsai & Phillips, 1991) e também *in vivo* sobre a colonização micorrízica (Siqueira et al., 1991 a; b). Por isso, a formononetina apresenta grande potencial para aplicação comercial como um "aditivo" para solo (United State Patent, 1991; Siqueira et al., 1992). Seu emprego contribuirá para maximizar os benefícios dos fungos micorrízicos indígenas na produção agrícola e reduzir o impacto da agricultura sobre o meio ambiente. Para isto torna-se necessário um melhor entendimento do modo de ação desta substância no fungo diretamente e na simbiose micorrízica. No presente trabalho são relatados os efeitos da aplicação no solo de soluções contendo formononetina em diferentes concentrações na formação de micorriza arbuscular da soja e do milho, avaliados em várias épocas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo constou de dois experimentos, realizados em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo, utilizando-se plantas de milho (*Zea mays* L.) var. IAC-106, e soja (*Glycine max* (L.) Merrill) var. Doko.

Utilizou-se um Latossolo Vermelho Amarelo, argiloso, fase cerrado coletado na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) no município de Patrocínio - MG. Amostra de solo foi peneirada em malha de 4 mm, seca ao ar e armazenada. Antes de ser usado recebeu calcário dolomítico (PRNT=92%) na base de 3.600 kg.ha⁻¹, sendo em seguida umedecido e incubado por 30 dias, quando apresentou pH em água (1:2,5)=6,0; Ca=3,2 mol.kg⁻¹, Mg=1,2 mol.kg⁻¹, Al=0,1 mol.kg⁻¹, extraídos com KCl 1 mol.L⁻¹ e determinado por titulometria; P=1 mg.kg⁻¹, K=50 mg.kg⁻¹, extraídos com Mehlich I e determinados P por colorimetria e K por fotometria de chama. Após a calagem o solo foi adubado com superfosfato simples de modo a fornecer 80 e 120 mg.kg⁻¹ de P₂O₅ para a soja e milho, respectivamente. A aplicação de superfosfato simples elevou o nível de P extraível no solo para 15 e 22 mg.kg⁻¹, respectivamente.

O solo não foi fumigado e apresentou média de 3 esporos/10mL de solo, tendo como espécies nativas *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Glomus occultum*

Walker e *Acaulospora scrobiculata* Spain e Schenk. Para elevar a densidade de esporos do solo adicionou-se inóculo de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, obtido de vaso de cultivo com *Brachiaria decumbens* Stapf. Após a inoculação o solo apresentou a densidade média de 1,8 esporos/ml. Para contagens, os esporos foram extraídos por peneiramento via úmida (Gerdemann & Nicolson, 1963) e centrifugação em sacarose.

Sementes de soja e milho, pré-germinadas, foram plantadas em vasos com 4,5 kg de solo, onde os tratamentos foram aplicados. As sementes de soja foram inoculadas com rizóbio (*Bradyrhizobium japonicum*) inoculante a base de turfa, fornecido pelo CNPAB-Embrapa, Seropédica, RJ. Conduziu-se o experimento, com duas plantas por vaso, durante 42 e 51 dias para o milho e soja, respectivamente. A umidade do solo foi controlada através de pesagens diárias, mantendo-se a umidade em 65% do volume total de poros.

No primeiro experimento, avaliou-se separadamente o efeito da formononetina no milho e na soja em diferentes épocas de crescimento, através de fatorial 2x4, sendo ausência e presença de formononetina (5 mg.L⁻¹ = 15,6 µM.L⁻¹) e quatro épocas, dispostos inteiramente ao acaso com 5 repetições. Empregou-se formononetina (7-hidroxi, 4'-metoxi isoflavona, massa molecular 320.5) sintética fornecida pela RhizoTech, Inc. (Hopewell, New Jersey, USA). O composto foi dissolvido em pequeno volume de metanol (não mais que 1% do volume final), e em seguida diluído em água destilada até a obtenção da concentração desejada (Siqueira et al., 1991b). Nas testemunhas, aplicou-se água destilada com igual volume de metanol. O volume de solução aplicada foi de 400mL/vaso, correspondendo a 50% do volume total de poros, sendo a aplicação realizada através de orifícios feitos na superfície do solo. O milho foi avaliado aos 18, 30, 36 e 42 dias após a semeadura, enquanto a soja foi aos 18, 30, 36 e 51 dias. No segundo experimento, desenvolvido no mesmo solo e nas mesmas condições experimentais, avaliaram-se os efeitos de concentrações da solução de formononetina, 0, 5, 10 mg.L⁻¹ (correspondente a 15,6; 31,2 e 46,8 µM.L⁻¹), aplicadas no solo no ato da semeadura. Os tratamentos foram dispostos inteiramente ao acaso com 5 repetições. As avaliações neste experimento foram realizadas aos 42 dias no milho e 51 dias na soja.

Nas avaliações determinaram-se a matéria seca da parte aérea e os parâmetros da formação de micorriza em amostras de raízes clarificadas e coloridas (Kormanik & McGraw, 1982). A porcentagem do comprimento de raiz colonizada (% colonização) foi estimada pelo método de placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980). Visando obter

informações mais específicas sobre a colonização, o número de arbúsculos, vesículas e pontos de entradas primários foram avaliados conforme Wilson (1984). Para isso, preparou-se para cada repetição, uma lâmina com trinta segmentos de raiz de 10 mm de comprimento, retirados ao acaso das amostras, e fixados em glicerina. As lâminas foram avaliadas através de observações microscópicas (100 a 200x) das estruturas fúngicas na raiz, sendo os resultados expressos em n°/mm de raiz. A matéria seca da parte aérea foi moída e encaminhada para determinação dos teores de nutrientes no Laboratório de Análise de Tecidos Vegetais do DCS/UFLA.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, correlações lineares e testes de médias (Tukey 5%) pelo programa estatístico SANEST, conforme modelo de delineamento experimental adotado. A fim de se obter homocedasticidade, os dados referentes a contagens (densidades de arbúsculos, vesículas, pontos de entradas e número de nódulos) foram transformados em $\sqrt{X+0,5}$; a percentagem de colonização transformados em $\arcsen \frac{\sqrt{X}}{10}$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os efeitos da aplicação de formononetina no solo nos parâmetros da colonização micorrízica da soja variaram com o tempo de avaliação (Tabela 1). A porcentagem de colonização aumentou com a época e foi maior nas plantas com formononetina em todas as épocas, exceto na última avaliação enquanto o comprimento de raiz colonizada só foi maior aos 30 dias. A densidade de arbúsculos também aumentou com o tempo, mostrando efeitos para formononetina aos 30, 36 e 51 dias. A densidade de vesículas que também aumentou com o tempo só mostrou efeito para formononetina aos 36 dias, enquanto para a densidade de pontos de entrada o efeito estimulante da formononetina só ocorreu aos 30 dias, quando plantas com formononetina apresentaram densidade de pontos de entrada 86% superior à aquelas sem formononetina. A produção de matéria seca e a nodulação aumentaram com o tempo, porém não foram influenciadas ($P < 0,05$) pela aplicação de formononetina. Isto confirma que este isoflavonóide não é indutor ativo de genes *nod* do rizóbio que nodula a soja (Kosslak et al., 1987; Hungria, 1994).

No milho o efeito da formononetina foi também dependente da época de avaliação em todos os parâmetros da colonização (Tabela 2). A colonização micorrízica foi favorecida pela formononetina em todas as épocas avaliadas, enquanto o comprimento da raiz colonizada e a densidade de arbúsculos e vesículas só não foram estimulados aos 18 dias. A

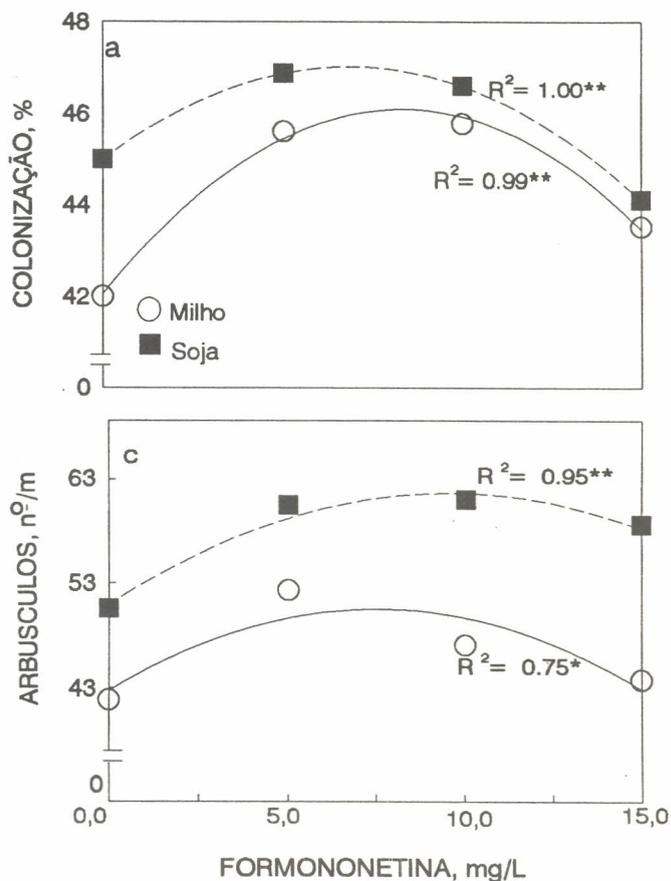


FIGURA 1- Efeito da formononetina aplicada ao solo na colonização micorrízica e densidade de arbúsculos nas raízes de milho e soja.

densidade de pontos de entrada foi aumentada apenas aos 30 e 36 dias. Verificou-se que a aplicação de formononetina alterou o processo de colonização, conforme revelado pelo modelo matemático ao qual se ajustou os parâmetros da colonização. Na presença de formononetina, o modelo que descreve a evolução da colonização foi o quadrático, enquanto na ausência, este foi linear ou sem nenhum ajuste. A formononetina acelerou a colonização, tal como verificado para efeito desta substância na colonização do trevo onde este efeito foi semelhante ao observado quando elevou-se a densidade de propágulos no solo (Siqueira et al., 1991b). Assim como foi verificado para a soja, a aplicação de formononetina não influenciou a produção de matéria seca do milho.

Verificou-se também efeitos da concentração de formononetina na formação de micorriza tanto no milho quanto na soja (Figura 1). Para a porcentagem de colonização e densidade de arbúsculo, o efeito da concentração seguiu modelo quadrático em ambas as espécies, sendo que na soja encontraram-se valores mais altos para estas duas variáveis, do que no milho. As demais variáveis da micorrização apresentaram respostas semelhantes a colonização e arbúsculos,

TABELA 1- Aplicação de formononetina (Form) nos parâmetros de colonização micorrízica e matéria seca da parte aérea da soja em diferentes épocas de avaliação. Médias de 5 repetições.

Parâmetros	Form	Época de avaliação, dias				Regressão ¹	
		18	30	36	51	Modelo	R ²
Colonização, %	-	14,32bC	31,48bB	49,48bA	49,96aA	s.a.	-
	+	17,7aC	41,72aB	53,59aA	53,25aA	s.a.	-
Comp. raiz colonizada, m/m	-	0,16aC	0,35bB	0,61aA	0,57aA	s.a.	-
	+	0,10aB	0,57aA	0,57aA	0,65aA	s.a.	-
Arbúsculos, n/m raiz	-	143,8aC	394,2bA	322,3aAB	252,3bB	s.a.	-
	+	97,4aC	609,2aA	400,9aB	356,9aB	s.a.	-
Vesículas, n/m raiz	-	0,6aC	2,7aBC	4,3bB	26,1aA	Q	0,98*
	+	0,1aC	1,06aC	9,3aB	25,0aA	Q	1,00*
Pontos de entrada, n/m raiz	-	2,0aB	12,7bA	15,7aA	17,3aA	Q	0,99*
	+	4,5aB	23,7aA	21,5aA	19,7aA	Q	0,94*
Mat. seca, g	-	0,43aD	1,57aC	3,08aB	9,84aA	Q	0,94*
	+	0,45aD	1,69aC	3,37aB	10,20aA	Q	1,00*
Nódulos, n/planta	-	-	30aB	42aA	54aA	Q	0,99*
	+	-	31aB	54aA	51aA	Q	0,99*

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. As letras maiúsculas comparam médias entre as épocas de avaliação, e as minúsculas aplicação de formononetina (+ com, - sem)

1) Modelos de regressão de melhor ajuste. Q - modelo quadrático; s.a. sem ajuste; *R² altamente significativo (P<0,01).

por isto não são apresentados. Os benefícios da formononetina na colonização e densidade de arbúsculo foram maiores nas concentrações entre 5 e 10 mg.L⁻¹, concordando com resultados de Siqueira et al., (1991b) para o trevo em mistura de solo e areia. Embora fora dessa faixa tenha havido redução do estímulo à formação de micorriza, não foi observado efeito inibitório em relação ao controle até a concentração de 15 mg.L⁻¹. A produção média de massa seca do milho foi de 7,0 ± 0,5 g/planta, sendo esta não influenciada pela adição de formononetina, tal como ocorreu no primeiro experimento. Para a soja verificou-se aumento linear ($y = 9,89 + 0,62x$; R² = 0,94**) da matéria seca em função das doses de formononetina. Entretanto, o efeito máximo do composto foi de apenas 9,4% sobre o controle.

A aplicação de formononetina estimulou o desenvolvimento de micorriza nas duas espécies estudadas. Além de acelerar a formação de micorriza, esta substância elevou os valores máximos atingidos para diversos parâmetros da colonização, durante o período estudado. As diferenças dos efeitos

quantitativos da formononetina nas duas espécies, não puderam ser esclarecidas com base neste estudo, mas estas podem estar relacionadas a natureza dos exsudatos radiculares do milho e da soja. D'arcy-Lameta (1986) identificou comestrol dentre os isoflavonóides exsudados pela soja e Morandi et al.(1992) verificou que este composto é capaz de estimular o crescimento micelial de fungo micorrízico. Como não existe evidência de especificidade dos flavonóides sobre os fungos micorrízicos arbusculares, a presença de comestrol e outros flavonóides ativos na rizosfera da soja, e a ausência destes no milho, pode ter contribuído para menor efeito da formononetina exógena na leguminosa, que produz estas substâncias.

Os teores e acúmulo de nutrientes na planta foram pouco influenciados pela formononetina, por isto somente alguns aspectos mais relevantes são comentados a seguir. Na soja, os teores e quantidade acumulada de nutrientes foram influenciados (P<0,05) pela época de avaliação mas não pela aplicação de formononetina. Os teores de P, no qual se espera maior efeito da colonização micorrízica

TABELA 2- Aplicação de formononetina (Form) aos parâmetros de colonização micorrizica e matéria seca de parte aérea de milho em diferentes épocas de avaliação. Médias de 5 repetições.

Parâmetros	Form	Época de avaliação, dias				Regressão	
		18	30	36	42	Modelo	R ²
Colonização, %	-	28,28bC	36,40bB	42,84bA	44,76bA	L	0,98*
	+	34,54aB	49,42aA	49,82aA	51,03aA	Q	0,97*
Comp. raiz colonizadas, m/m	-	0,17aB	0,23bB	0,41bA	0,38bA	L	0,81*
	+	0,21aB	0,55aB	0,55aA	0,56aA	Q	0,96*
Arbúsculos, n/m raiz	-	132,7aB	132,4bB	229,2bA	173,8bAB	s.a.	-
	+	128,4aC	466,8aAB	411,8aAB	309,2aB	Q	0,99*
Vesículas, n/m raiz	-	1,2aB	1,1bB	15,3aA	12,4bA	s.a.	-
	+	2,7aC	16,0aB	22,9aB	45,9aA	L	0,97*
Pontos de entrada, n/m raiz	-	5,0aB	5,8bAB	8,7bA	8,0aA	s.a.	-
	+	4,4aB	14,4aA	14,2aA	14,8aA	Q	0,98*
Mat. seca, g	-	0,63aB	2,10aC	4,70aB	7,10aA	-	-
	+	0,65aD	1,90aC	4,29aB	6,95aA	-	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. As letras maiúsculas comparam médias entre as épocas de avaliação, e as minúsculas aplicação de formononetina (+ com, - sem).

1) Modelos de regressão de melhor ajuste. L - linear, Q - quadrático, s.a. sem ajuste. * R² significativo a P<0,01.

(Fernandes et al., 1987), variaram de 1,8 a 2,5 mg.kg⁻¹ na matéria seca da parte aérea, indicando suprimento adequado deste nutriente pelo solo utilizado e, conseqüentemente redução do benefício resultante do aumento da formação de micorriza (Paula & Siqueira, 1988) induzido pela aplicação de formononetina. No milho, os teores de todos os nutrientes diminuíram com a idade das plantas. Plantas com formononetina apresentaram teores mais elevados (P < 0,05) de K, Ca, S, Fe, Zn e Mn que aquelas que não receberam o composto. Estes efeitos foram mais acentuados para Zn. Plantas com formononetina, aos 36 dias da semeadura, apresentaram 39 mg.kg⁻¹ de Zn na parte aérea contra apenas 25 mg.kg⁻¹ naquelas sem formononetina, portanto, teores 50% maiores para este nutriente, que é crítico para o milho em solos como o utilizado no presente estudo. Entretanto, isto não foi suficiente para estimular a produção de massa seca da planta. Os teores de P nos tecidos foram também elevados (1,0 a 1,2 mg.kg⁻¹) para estas condições (Fernandes et al., 1987).

O efeito estimulante da formononetina na formação de micorriza corrobora outros estudos com milho e trevo (Fries et al., 1996; Siqueira et al., 1991a, b). Entretanto, a magnitude da resposta para colonização no presente estudo, da ordem de 30%, difere da obtida em estudo anterior com trevo em cultura de

solo - areia em condições de câmara de crescimento, onde formononetina exógena aumentou em 200% a porcentagem de colonização micorrizica. O elevado potencial de inóculo micorrizico do solo, comprovado pela alta porcentagem de colonização comparada com os resultados obtidos por outros autores para as espécies estudadas (Fernandes et al. 1987, Pereira 1986, Paula et al. 1990), e a condição favorável de disponibilidade de fósforo no solo (altos teores no tecido), podem ter contribuído para o menor efeito estimulante da formononetina na colonização e sua ineficácia como promotor de crescimento da planta micorrizada.

Esses resultados não permitem delinear o modo de ação da formononetina sobre a formação de micorriza. Entretanto, o efeito estimulante deste composto na formação de micorriza e o fato do seu efeito sobre os pontos de entrada ocorrer independente da época de avaliação, indicam que o estímulo na micorrização resulta da formação de maior número de apressórios e/ou de pontos de entradas. Estas respostas do fungo ocorrem na presença das raízes ou seus metabólitos (Becard & Piché, 1989; Paula & Siqueira, 1990), onde formononetina pode estar presente e como já foi sugerido (Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Nair et al., 1991), os flavonóides facilitam a interação fungo - planta, o que influencia o desenvolvimento da

micorriza. Os mecanismos bioquímicos responsáveis pela atividade da formononetina ainda não são conhecidos, mas evidências indicam que ela suprime a atividade da enzima peroxidase que atua de modo restritivo à entrada do fungo na raiz (Fries et al., 1996). Estas considerações e o conhecimento do envolvimento dos flavonóides ou produtos de sua degradação, no processo de reconhecimento do hospedeiro por plantas parasíticas, que infectam raízes (Siqueira et al., 1991c), indicam que a formononetina pode atuar como indutor da formação de apressório, aumentando a densidade de pontos de entrada do fungo na raiz e a colonização micorrízica. Por outro lado, considerando que a intensidade da formação de micorriza depende do contato fungo - raiz (Brundrett, 1991), o próprio estímulo do crescimento micelial assimbiótico do fungo pela formononetina como tem sido demonstrado *in vitro* (Baptista & Siqueira, 1994; Nair et al., 1991; Romero & Siqueira, 1996), facilitaria o contato fungo - raiz na fase de pré-colonização, o que resultaria na formação de maior número de pontos de entrada e maior colonização.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro, bolsas de pós-graduação e de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, M.J. & SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6(2):127-134, 1994.
- BÉCARD, G. ; DOUDS, D.D. & PFEFFER, P.E. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3):821-825, 1992.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, V. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, 112:77-83, 1989.
- BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 21:171-311, 1991.
- CHABOT, S.; BEL-RHLID, R.; CHEVERNET, R. & PICHÉ, Y. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions. *New Phytologist*, 122:461-67, 1992.
- D'ARCY-LAMETA, A. Study of soybean and lentil root exudates. II. Identification of some polyphenolic compounds relation with plantlet physiology. *Plant Soil*, 92:113-23, 1986.
- ELIAS, K.S. & SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8):1928-33, 1987.
- FERNANDES, A.B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L. & GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 11(2):101-08, 1987.
- FRIES, L.L.M.; PACOVSKY, R.S. & SAFIR, G.R. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in Corn (*Zea mays L.*) roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(8):981 - 988, 1996.
- GERDEMANN, J.L. & NICOLSON, T.H. Spore of mycorrhiza *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decating. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2):235-44, 1963.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. ; BRANZANTI, B. & GIANINAZZI, S. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root plant exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7:243-55, 1989.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:482-500, 1980.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18(3):339-364, 1994.
- KORMANIK, P.P. & MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular mycorrhizae in plant root. In: SCHENCK, N.C. ed. *Methods and principles of mycorrhizal research*, St. Paul, APS, 1982. p.37-45.
- KOSSLAK, R.M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H.E. & APPELBAUM, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavonoids isolated from *Glycine max*. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 84:7428-7432, 1987.
- MORANDI, D.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Effect of some plant flavonoids on *in vitro* behaviour of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Agronomie*, 12:811-16, 1992.
- NAIR, M.G.; SAFIR, G.R. & SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied Environmental Microbiology*, 52:434-439, 1991.
- PAULA, M.A. & SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. *New Phytologist*, 115:69-73, 1990.

- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, L.H. & OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrizicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. *Revista Brasileira Ciência Solo*, 12:25-31, 1988.
- PEREIRA, P.B.R. **Estudo da eficiência de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares para a soja em amostras de latossolo**. Viçosa, UFV, 1986. 73 p. Dissertação MS.
- ROMERO, A.G.F. & SIQUEIRA, J.O. Atividade de flavonóides sobre esporos do fungo micorrízico *Gigaspora gigantea* in vitro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31(7): 517- 522, 1996.
- SIQUEIRA, J.O. Micorrizas arbusculares. In: *Microrganismos de importância agrícola*. ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M. (Eds.). Brasília, EMBRAPA, 1994. p.151-194.
- SIQUEIRA, J.O.; BROWN, D.G.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Fields application of the VA mycorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (Rhizotropin™) on corn and soybean in Brazil. In: **THE INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS**, Perth, 1992. **Proceedings of...** Perth, University of Western Australia, 1992. p.132
- SIQUEIRA, J.O. & SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. VA-mycorrhizae and mycorrhizal stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, 34:233-42, 1991a.
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Stimulation of vesicular arbuscular mycorrhizal formation and plant growth by flavonoid compounds. *New Phytologist*, 118:87-93, 1991b.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR M.G.; HAMMERSCHMIDT, R. & SAGIN, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. *Critical Review Plant Science*, 10(1):63-121, 1991c.
- TSAI, S.M. & PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spore in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5):1485-88, 1991.
- UNITED STATE PATENT. Method and Compositions for stimulating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Inventors: Gene R. Safir; Muraleedharan G. Nair; José O. Siqueira. Patent Number 5.001.603, March, 26, 1991.
- WILSON, J.M. Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 97(3):413-426, 1984.

Brazilian Journal of Plant Physiology

homepage - <http://200.19.230.10>

Reviews, mini-reviews, methodological, observational and theoretical articles about contemporary issues of plant physiology, from authors of any country, can be published at *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (RBFV)*.

Be sure that your library is a RBFV subscriber.

Some complete RBFV collections were saved to attend specific demands.